Reprinted from
Biochimica et Biophysica Acta
Elsevier Publishing Company
Amsterdam
Printed in The Netherlands

BBA 35097

ÉTUDE STRUCTURALE DU TRYPSINOGÈNE ET DE LA TRYPSINE. LES DIAGRAMMES D'ÉTAT

M. LAZDUNSKI ET M. DELAAGE*
Institut de Chimie Biologique, Faculté des Sciences, Marseille (France)

(Reçu le 22 décembre, 1966)
(Manuscript revisé reçu le 27 april, 1967)

SUMMARY

Structural studies on trypsinogen and trypsin. State diagrams

The stability of the different molecular forms of trypsinogen and trypsin is a function of temperature and pH. At 20°, the acidification of trypsinogen or trypsin from pH 8 to pH 0.5 involves the appearance of 3 reversible equilibria designated I $\rightleftharpoons$ II $\rightleftharpoons$ III $\rightleftharpoons$ IV for trypsin, I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ $\rightleftharpoons$ IV′ for trypsinogen. The reversible thermal denaturation of any of these molecular species produces a form D′ for trypsinogen, D for trypsin. These different forms have been placed in state diagrams where the pH and temperature ranges in which they can be observed are defined. The most important structural change in the alkaline range involves the unmasking of the abnormal tyrosines; it is reversible but followed very rapidly by an irreversible denaturation due to desulfuration.

The diagrams have been described thermodynamically. I, II, III and I′, II′, III′ are essentially stabilized by hydrophobic interactions.

The isomerisations I $\rightleftharpoons$ II $\rightleftharpoons$ III and I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ are due to the unmasking of abnormal ionizable groups which have been identified as 2 carboxylate ions for II $\rightleftharpoons$ III and II′ $\rightleftharpoons$ III′.

The state diagrams allow us to establish some of the relationships between the molecular and functional properties of trypsinogen and trypsin. A comparison of the molecular forms of the zymogen and the enzyme give a better knowledge of the morphological changes occurring during activation and provide a better understanding of its mechanism.

INTRODUCTION

Grâce aux groupes de NEURATH[1] et de SORM[2] la séquence du trypsinogène de boeuf a été récemment élucidée. Dès 1955, NEURATH[3] et DESNUELLE[4] montraient que son activation en trypsine faisait suite à la rupture de la sixième liaison N-terminale de la chaîne avec élimination de l'hexapeptide Val–$(Asp)_4$–Lys. Les éléments fonctionnels du centre actif de la trypsine de boeuf constitués par un résidu de sérine[5] et un

* Ce travail fait partie d'une thèse de Doctorat-ès-Sciences Physiques présentée par M. Delaage à la Faculté des Sciences de l'Université d'Aix-Marseille. No. d'ordre 1235.

UNIV. LEIDEN BIBL.

résidu d'histidine[6] sont désormais localisés dans la séquence[2] et le mécanisme de la catalyse trypsique est l'un des mécanismes enzymatiques les mieux compris. Pour toutes ces raisons, le trypsinogène et la trypsine de boeuf sont des macromolécules de choix pour qui désire établir les relations entre la structure spatiale et la fonction.

Les travaux du groupe d'ANFINSEN[7] et ceux, plus récents, qui ont abouti à la synthèse chimique de l'insuline[8] prouvent abondamment que l'appareil génétique détermine la conformation des protéines par le seul contrôle de la structure primaire. Il peut cependant exister, en milieu aqueux, plusieurs espèces moléculaires issues d'une même séquence; leur stabilité dépendra principalement des 2 paramètres, le pH et la température, qui conditionnent la stabilité des interactions non covalentes (liaisons hydrogène, interactions électrostatiques et hydrophobes). Les recherches présentées dans cet article font suite à une série de travaux déjà publiés[9,10]. Elles ont abouti, avec le trypsinogène comme avec la trypsine, à l'indentification de plusieurs formes moléculaires, en équilibre réversible, dont les stabilités thermodynamiques, les propriétés physicochimiques et fonctionnelles sont différentes. Ces formes ont été placées dans des diagrammes d'états où sont définies les zones de pH et de température dans lesquelles elles sont stables. La comparaison des diagrammes du trypsinogène et de la trypsine permet de mieux préciser quels sont les caractères structuraux du précurseur qui ont été conservés ou modifiés par l'activation et, partant, de mieux comprendre son mécanisme.

MÉTHODES EXPÉRIMENTALES

Les trypsinogènes et les trypsines

Les trypsinogènes de porc et de boeuf ont été purifiées selon les méthodes décrites par CHARLES *et al.*[11] et MAROUX, ROVERY ET DESNUELLE[12]. Ils sont homogènes en chromatographie, en ultracentrifugation et à l'électrophorèse sur polyacrylamide. Les trypsines sont obtenues au moyen de méthodes déjà décrites[11,13]. Les activités enzymatiques sont déterminées en utilisant la technique titrimétrique classique[13].

Spectroscopie différentielle ultra-violette

Les spectres différentiels et les courbes de transition sont déterminés au moyen d'un spectrophotomètre Cary Modèle 14. La température des cellules est régulée à $\pm 0.2°$. Les concentrations de protéine utilisées vont de 0.3 à 3 mg/ml. Le milieu n'est pas tamponné au dessous de pH 3. Les tampons utilisés au dessus de pH 3: acétate, citrate–phosphate, Tris–HCl à la concentration de 0.01 M, n'ont d'effet ni sur les spectres différentiels ni sur les courbes de transition. Les spectres différentiels sont faits en 0.1 M NaCl, les courbes de transition en 0.05 M NaCl; elles sont reproductibles à $\pm 0.5°$ près.

Dans toutes les expériences faites avec le trypsinogène, on ajoute de l'inhibiteur trypsique de soja dans un rapport pondéral de 1 % afin d'éviter toute activation du précurseur en trypsine.

Rotation optique

Quelques courbes de fusion ont été déterminées par polarimétrie à 365 mμ avec un spectropolarimètre photoélectrique Stanley. La température des cellules est contrôlée à $\pm$ 0.2°. La concentration des solutions de trypsinogène et de trypsine est environ 5 mg/ml.

Les paramètres caractéristiques de dispersion optique rotatoire, λ_c, a_0, b_0, H_{193} et H_{225} (bibl. 14) ont été déterminés entre 319 mμ et 579 mμ.

Courbes de fusion du trypsinogène et de la trypsine à des pH voisins de la neutralité

La vitesse de précipitation du trypsinogène dénaturé thermiquement est élevée dans la zone de pH comprise entre 5 et 8. Cette précipitation rapide empêche d'enregistrer en continu les changements de spectre produits par l'élévation de la température.

Le procédé utilisé consiste en un prééquilibrage thermique de la solution de protéine (0.5 mg/ml) à pH 3 (successivement aux températures t_1, $t_2..t_n$) suivi d'une variation brutale de pH à température constante provoquée par l'addition d'un tampon citrate–phosphate 0.01 M, pH x compris entre 5 et 8, contenant 0.3 M NaCl et prééquilibré à la même température. L'absorbance à 293 mμ, pH x et température t est lue moins de 20 sec après avoir introduit le tampon. Il est ainsi possible de gagner de vitesse la polymérisation.

Les courbes de transition de la trypsine ont été établies en suivant la perte d'activité de l'enzyme en fonction de la température. L'équilibre qui s'établit à une température donnée entre les trypsines native et réversiblement dénaturée est atteint en moins de 2 min (concentration totale de protéine 10^{-3} mg/ml). Il est alors "gelé" par dilution rapide dans l'urée 4.8 M en présence de *p*-toluènesulfonyl-L-arginine méthylester en concentration saturante. La présence de *p*-toluènesulfonyl-L-argininemethyl ester permet la détermination potentiométrique de la concentration de trypsine encore native et empêche la dégradation de l'espèce réversiblement dénaturée. Ces déterminations ne sont pas affectées de façon significative par l'autolyse.

Courbes de transition dans ^2H_2O

Les tampons utilisés ont été préparés par dissolution des sels nécessaires dans ^2H_2O. Le pH de ces tampons est ajusté avec ^2HCl ou NaO^2H (p^2H = pH (apparent) + 0.4). La protéine est dissoute dans le tampon, puis la solution est portée à une température suffisamment élevée pour qu'il y ait dénaturation thermique complète de la molécule. Tous les atomes d'hydrogène échangeables peuvent alors être remplacés par des atomes de deutérium. Le refroidissement conduit à la forme native deutérée; les courbes de transition sont alors établies par la méthode spectrophotométrique habituelle.

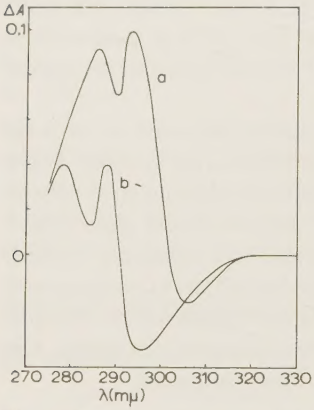
RÉSULTATS ET DISCUSSION

(1) Isomérisation du trypsinogène et de la trypsine à pH acides. Étude spectrophotométrique et spectropolarimétrique

Les spectres différentiels obtenus sont présentés dans la Fig. 1. Il en existe 2 types distincts. Entre pH 8 et 2, l'acidification produit 3 perturbations principales situées à 286, 293 et 306 mμ. A pH inférieurs à 2, les 3 perturbations principales persistent mais elles sont à 278, 288 et 296 mμ. Ces perturbations apparaissent aussi avec le trypsinogène de porc et les trypsines de porc et de boeuf. La modification structurale réversible produite par l'abaissement de pH fait passer un certain nombre de résidus de tyrosine et de tryptophane d'un milieu apolaire (intérieur de la molécule) à un milieu polaire (solvant aqueux)[15].

L'effet du pH sur $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ pour le trypsinogène de boeuf à 30° et la trypsine de boeuf à 10° est représenté dans la Fig. 2. Les variations de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ et $\Delta\varepsilon_{286m\mu}$ en fonction du pH sont en phase comme cela avait déjà été observé avec les trypsines de boeuf et de porc[9]. L'acidification des solutions de protéine de pH 8 à 2 produit 2 transitions structurales réversibles I $\rightleftharpoons$ II $\rightleftharpoons$ III pour la trypsine, I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ pour le trypsinogène. L'amplitude de la variation de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ est pratiquement la même pour toutes les transitions. Ces transitions ont été étudiées à plusieurs températures comprises entre 10° et 40°.

Il se produit au dessous de pH 2 une troisième modification structurale, III $\rightleftharpoons$ IV pour la trypsine et III′ $\rightleftharpoons$ IV′ pour le trypsinogène. Elle a été mise en évidence en suivant l'influence du pH sur $\Delta\varepsilon_{288m\mu}$. L'amplitude de la variation de



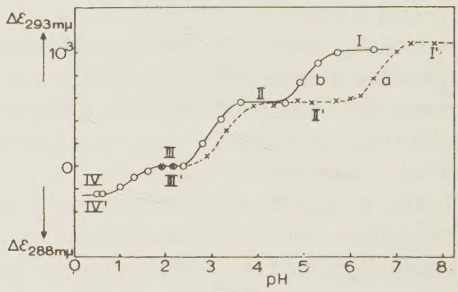
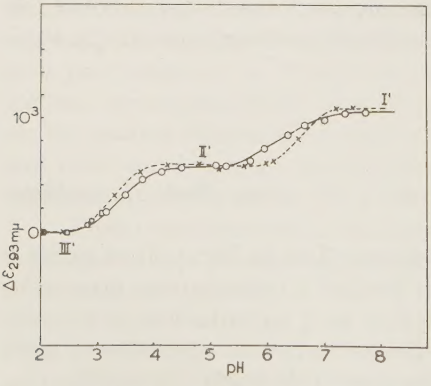


Fig. 1. Spectres ultraviolet différentiels obtenus avec le trypsinogène de boeuf à 2.5 mg/ml, force ionique 0.1. a, Cellule de référence pH, 2 cellule test pH 7; b, cellule de référence pH 1, cellule test pH 2.

Fig. 2. Influence du pH sur $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ ou $\Delta\varepsilon_{288m\mu}$. Les solutions de protéines (0.3 à 3 mg/ml) sont comparées à une solution de même concentration à pH 2.0. La force ionique est 0.1 dans tous les cas. a, Trypsinogène à 30°; b, trypsine à 10°. I, II, III, IV, représentent différentes formes moléculaires de la trypsine; I′, II′, III′, IV′ représentent différentes formes moléculaires du trypsinogène.



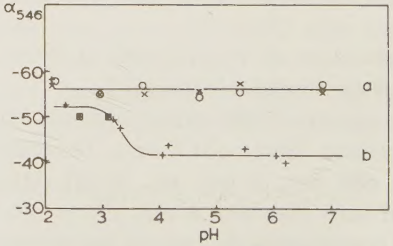


Fig. 3. Influence de la force ionique sur les isomérisations I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ du trypsinogène. ×, Force ionique 0.1; ○, force ionique 0.3.

Fig. 4. Influence du pH sur le pouvoir rotatoire du trypsinogène et de la trypsine mesuré à 546 mμ. Force ionique 0.1. a, Trypsinogène; ×, 2°; ○, 20°. b, Trypsine; +, 2°; ⊞, 20°.

$\Delta\varepsilon_{288m\mu}$ est pratiquement la même pour III $\rightleftharpoons$ IV et III' $\rightleftharpoons$ IV'. L'amplitude des variations de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ ou de $\Delta\varepsilon_{288m\mu}$ lors de la transformation d'une forme moléculaire en une autre est pratiquement indépendant de la température entre 10° et 40° pour le trypsinogène comme pour la trypsine.

La Fig. 3 montre que la force ionique est sans grande influence sur la position et l'amplitude des transitions I' $\rightleftharpoons$ II' et II' $\rightleftharpoons$ III'.

Le coefficient de sédimentation du trypsinogène est le même à pH 1.92, 5.03 et 6.90 à 20°; sa valeur est de 2.5 S. Les formes I', II', III' sont donc monomères et possèdent des propriétés hydrodynamiques semblables. Cette conclusion s'applique aussi à la trypsine dont le coefficient de sédimentation est pratiquement identique à pH 8 et à pH 2.4 (bibl. 16).

La Fig. 4 présente l'influence du pH sur le pouvoir rotatoire du trypsinogène et de la trypsine de boeuf. Les mesures portant sur la trypsine ont été faites à des pH inférieurs à 6.2 dans le but d'éviter l'autolyse de l'enzyme qui se produit rapidement à pH alcalin en l'absence d'ions Ca^{2+} (bibl. 9). La polarimétrie ne permet de mettre en évidence que la transition II $\rightleftharpoons$ III de la trypsine; les formes I et II ont le même pouvoir rotatoire. D'autre part il s'est avéré impossible de trouver des changements significatifs du pouvoir rotatoire du trypsinogène de boeuf entre pH 2 et pH 11. Les différentes formes moléculaires du zymogène ont donc les mêmes caractéristiques rotatoires.

(2) *Étude de la dénaturation thermique du trypsinogène et de la trypsine*

La dénaturation thermique des trypsinogènes de porc et de boeuf démasque des résidus de tryptophane et de tyrosine enfouis dans l'intérieur hydrophobe de la structure native. Les trypsines se comportent de la même manière[9]. La plupart des courbes de transition ont été déterminées par spectrophotométrie à 293 mμ.Cependant comme dans le cas des trypsines[9], les résultats sont les mêmes à 287 mμ. Quelques courbes de transition sont représentées dans la Fig. 5. Il en existe 2 types bien différents. A pH acides, la transition entre la forme moléculaire III' du trypsinogène (pH 2.13) stable à 20° et la forme moléculaire D' dénaturée thermiquement et stable à 60° se fait en une seule étape. A pH 7.25 la transition entre la forme stable I' du trypsinogène et la forme D' dénaturée thermiquement et stable à 90° s'effectue en

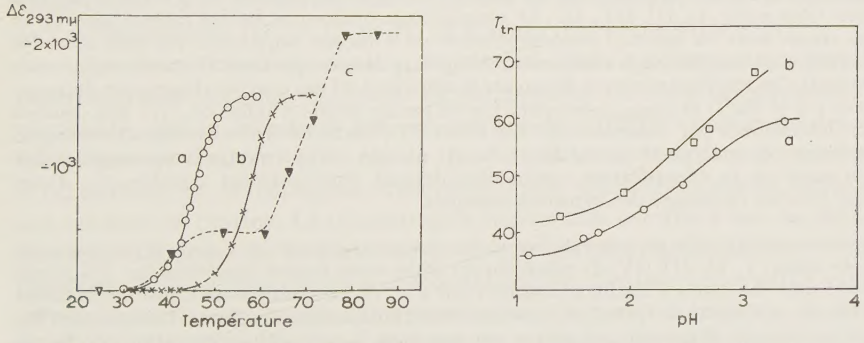


Fig. 5. Variation de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ avec la température (courbes de transition). a, Trypsinogène à pH 2.13; b, trypsine à pH 2.98; c, trypsinogène à pH 7.25.

Fig. 6. Influence du pH sur les températures de transition des trypsinogènes de boeuf (a) et de porc (b).

2 étapes. Il y a, dans ce dernier cas, formation intermédiaire d'une forme moléculaire stable entre 50° et 60°. L'amplitude de la variation de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ correspondant à la première étape de cette dénaturation thermique est égale à l'amplitude observée pour la transition $I' \rightarrow II'$ (Fig. 2). La variation de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ correspondant à la seconde étape est égale à celle de la transition $II' \rightleftharpoons D'$ du trypsinogène à pH 4.20. La transition thermique à pH 7.25 s'effectue donc de la manière suivante: $I' \rightarrow II' \rightarrow D'$. Ce résultat a été confirmé comme la suite de cet article le montrera (Fig. 7). Pour le trypsinogène comme pour la trypsine[18] les caractéristiques thermodynamiques des transitions thermiques sont les mêmes, qu'elles soient déterminées par spectrophotométrie, par polarimétrie ou par perte de l'activité enzymatique[19].

Les températures de transition des trypsinogènes de porc et de boeuf dépendent considérablement du pH (Fig. 6). Le trypsinogène de porc a une stabilité thermique supérieure à celle du trypsinogène de boeuf. Cette plus grande stabilité se manifeste d'ailleurs aussi vis à vis de la dénaturation alcaline[17]. La trypsine de porc est aussi plus stable que la trypsine de boeuf vis à vis des dénaturations alcaline, acide et thermique[9]. Les caractères structuraux qui rendent le trypsinogène de porc plus stable que le trypsinogène de boeuf sont donc conservés dans la trypsine correspondante.

(3) *Les diagrammes d'états*

(a) *pH acides.* Les différentes formes moléculaires du trypsinogène et de la trypsine de boeuf qui ont pu être identifiées entre pH 1 et 14 et entre 0° et 80° ont été placées dans un système de coordonnées température–pH* (Figs. 7 et 8).

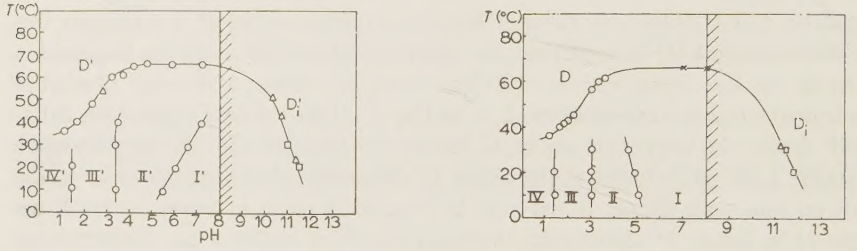


Fig. 7. Diagramme d'état du trypsinogène de boeuf. La figure est séparée en 2 régions par une zone hachurée. Côté acide: I', II', III', IV', D' représentent différentes formes moléculaires de la protéine. Les tracés sont les lignes d'isoconcentration de 2 formes adjacentes (ce sont aussi les courbes de variation en fonction de la temperature du pK_{app} des groupes dont l'ionisation gouverne les isomérisations). Ces tracés passent par les points d'inflexion (○) des courbes $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ ou $\Delta\varepsilon_{288m\mu}$–pH (établies en 0.1 M NaCl) et $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$–température ou par les points d'inflexion (△) des courbes de transition déterminées par polarimétrie. Côté alcalin: D_i', la forme irréversiblement dénaturée est placée non dans la zone de température et de pH où elle est thermodynamiquement stable mais dans la zone où la dénaturation irréversible devient cinétiquement possible. □, Point d'inflexion des courbes de titrage des tyrosines masqués.

Fig. 8. Diagramme d'état de la trypsine de boeuf. La figure est séparée en 2 parties par une zone hachurée. Côté acide: I, II, III, IV, D représentent différentes formes moléculaires. Les tracés qui les séparent sont des lignes d'isoconcentration (voir Fig. 7). Le symbolisme utilisé est le même que dans la Fig. 7. ×, Courbe de transition suivie en mesurant la perte d'activité. Côté alcalin: D_i, la forme irréversiblement dénaturée, est placée non pas dans la zone pH–température où elle est thermodynamiquement stable mais dans la zone où la formation devient cinétiquement possible.

* Il existe sans doute plusieurs variétés moléculaires de la forme D ou de la forme D' qui pourraient aussi être placées dans le plan pH–température. Il ne nous a pas paru nécessaire de les rechercher.

La transformation d'une forme moléculaire en une forme moléculaire adjacente est pratiquement instantanée et bien réversible[10]. Il est d'ailleurs possible de faire subir au zymogène comme à l'enzyme des cycles de modifications structurales tels que par exemple I → III (ou IV) → I pour la trypsine et I′ → II′ → D′ → III′ → I′ par le trypsinogène sans perdre plus de 15 à 20 % de l'activité ou de l'activité potentielle initiale.

(*b*) *pH alcalins*. Les modifications structurales qui se produisent aux pH supérieurs à 8 ont été étudiées soit à pH constant et température variable en établissant les courbes de transition par polarimétrie à 365 mμ, soit à température constante et pH variable, en étudiant par titrage spectrophotométrique le démasquage des résidus de tyrosine anormaux à pH très alcalins[9,17]. Les 2 techniques ne nous indiquent qu'un seul changement de la conformation du trypsinogène et de la trypsine à pH alcalin. En fait, cette modification de structure est sans doute la plus importante de celles qui se produisent dans cette zone de pH, mais elle n'est pas la seule. Il existe déjà à des pH bien inférieurs un changement morphologique de la trypsine qui permet d'expliquer l'autolyse très rapide observée entre pH 8 et 10 (bibl. 9). C'est précisément cette autolyse qui empêche malheureusement d'étudier par des mesures physico-chimiques directes, les équilibres entre les différentes formes moléculaires de l'enzyme dans cette zone de pH. Il est possible cependant de faire l'étude en présence de Ca^{2+} (bibl. 9) ou à force ionique très élevée[20] afin de ralentir considérablement l'autolyse. La spectropolarimétrie des trypsines de porc et de boeuf[9] permet d'observer dans ces conditions, une modification structurale déjà très avancée à pH 10. L'étude physicochimique de la structure du trypsinogène à des pH modérément alcalins ne présente pas les mêmes difficultés. SMILLIE ET KAY[21] ont pu mettre en évidence des variations de la viscosité et du coefficient de sédimentation du trypsinogène de boeuf commençant à pH 10 à 10°. L'étude cinétique de la dénaturation du trypsinogène de boeuf par l'urée, nous montre[22] également qu'il se produit une modification structurale importante dès pH 10. Nous avons tenté d'étudier ce changement de structure par spectropolarimétrie. λ_c reste à peu près indépendante du pH; elle est respectivement 241, 238, 241, 238 ± 0.3 mμ à 10° aux pH 7.0, 8.44, 9.44 et 11.0. Nos résultats sont en accord sur ce point avec ceux de NEURATH[23] obtenus par polarimétrie à 589 mμ. Les modifications de structure situées entre pH 8 et 11 ne produisent donc pas de changements des caractéristiques rotatoires de la molécule; elles ressemblent en cela aux isomérisations III′ ⇌ II′ et II′ ⇌ I′ observées entre pH 2 et 8.

La seule transition alcaline représentée dans les diagrammes des Figs. 7 et 8 est irréversible dans les conditions expérimentales où elle a été observée. Cette irréversibilité, qui se manifeste sur les courbes de titrage[17] comme sur les courbes de transition est d'autant plus rapide que le pH et la température sont plus hauts. L'échantillon de trypsinogène irréversiblement dénaturé a perdu environ 17 % de son contenu en cystine. La dénaturation irréversible est due à une ou plusieurs modifications chimiques de la structure protéique portant particulièrement sur les ponts disulfure. Nous avons observé une dénaturation alcaline irréversible présentant les mêmes caractéristiques avec le trypsinogène de porc, la trypsine, le chymotrypsinogène A et l'α-chymotrypsine de boeuf. La ribonucléase subit aussi une dénaturation irréversible semblable[24]. Une étude cinétique comparée nous a permis d'établir que la désulfuration du trypsinogène ne peut s'effectuer qu'après le démasquage (d'abord reversible) des tyrosines anormales.

(4) Description thermodynamique des transitions

Tout changement de forme d'une protéine peut être décrit[9] par l'équation (1) qui est l'expression mathématique du mécanisme de dénaturation le plus simple décrit par TANFORD[25] et par BRANDTS[26].

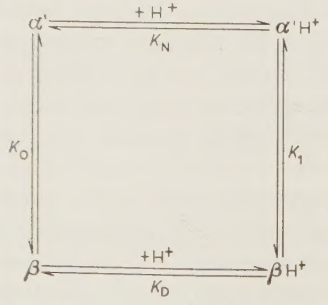
$$\Delta F^\circ = p(-NT\overline{\Delta S_c}) + \sum_{i=1}^{x} \Delta f_{tr}^{i} + n\Delta h_H + \Delta F_{elec} + \Delta F_{titr} \qquad (1)$$

ΔF° représente la variation d'énergie libre associée au changement de forme moléculaire impliquant la fraction p des N amino acides totaux. Nous l'appelons ΔF°_{th} lorsqu'il s'agit d'une dénaturation thermique. $n\Delta\overline{h}_H$ est le changement d'enthalpie correspondant à la rupture de n liaisons hydrogène inter-amide. $\Delta\overline{S}_c$ est l'augmentation moyenne de l'entropie conformationnelle par résidu. Δf_{tr}^{i} est le changement d'énergie libre unitaire correspondant au transfert du résidu i de l'environnement qu'il a dans la protéine native à celui qu'il aura dans la protéine dénaturée. ΔF_{elec} représente la contribution électrostatique à l'énergie libre de dénaturation. Si la protéine possède dans l'une des formes un certain nombre de groupes ionisables masqués qui deviennent normaux après une modification structurale due à un changement du pH ou de la température, le phénomène de démasquage apporte une contribution ΔF_{titr} à l'énergie libre de la dénaturation[9].

Isomérisations acides

A température constante et pH variables, les termes ΔF_{elec} et ΔF_{titr} sont les seuls qui changent. Les isomérisations I $\rightleftharpoons$ II $\rightleftharpoons$ III et I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ sont peu influencées par les changements de force ionique (Fig. 3); elles sont donc largement conditionnées par le terme ΔF_{titr}. Il en est de même pour la transition alcaline due à la dissociation des résidus de tyrosine anormaux[9].

A force ionique 0.3 à laquelle la contribution des effet électrostatiques locaux a pratiquement disparue (Fig. 3) la représentation log I′/II′ — pH a une pente de 1. La transformation I′ $\rightleftharpoons$ II′ est donc due à l'ionisation d'une seule fonction ionisable anormale[27] masquée dans I′ à l'état basique et démasquée dans II′ à l'état acide ou bien masquée dans II′ à l'état acide et démasquée dans I′ à l'état basique. La première solution semble la plus vraisemblable puisqu'un certain nombre d'autres amino acides tels la tyrosine et le tryptophane sont démasqués lors de I′ → II′. La transformation peut être représentée avec plus de détail par le schéma suivant:



Le groupe ionisable qui détermine l'isomérisation est masqué dans α′ et démasqué dans β′; dans les 2 cas, il est à l'état basique. Ce groupe est masqué dans α′H+ et démasqué dans β′H+; dans les 2 cas, il est à l'état acide. α′ $\rightleftharpoons$ β′ et α′H+ $\rightleftharpoons$

$\beta'H^+$ correspondent à un changement de conformation; $H^+ + \alpha' \rightleftharpoons \alpha'H^+$ et $H^+ + \beta' \rightleftharpoons \beta'H^+$ correspondent à un changement d'état d'ionisation sans modification de la conformation. En toute rigueur la forme I' est un mélange de α' et de β' ($(I') = (\alpha') + (\beta')$) tandis que la forme II' est un mélange de $\alpha'H^+$ et de $\beta'H^+$ ($(II') = (\alpha'H^+) + (\beta'H^+)$). En fait, la constance de l'amplitude de la variation de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ pour la transformation $I' \rightleftharpoons II'$ (malgré la variation de K_0* à différentes températures et différentes forces ioniques) indique que les formes moléculaires extrêmes sont pures; $(\beta') \ll (\alpha')$ et $(\alpha'H^+) \ll (\beta'H^+)$ de telle sorte que $(I') = (\alpha')$ et $(II') = (\beta'H^+)$. La fraction y de forme I' isomérisée à différents pH est donnée par l'équation (2).

$$y = \frac{K_{app}/H^+}{1 + K_{app}/H^+} \tag{2}$$

K_{app} est la constante apparente d'ionisation du groupe anormal;

$$pK_{app} = \log \frac{K_0}{K_D} \tag{3}$$

où $K_0 = \beta'/\alpha'$. K_0 reste très inférieure à 1 dans les conditions expérimentales choisies. La valeur de pK_{app} ne permet pas d'identifier la fonction dont l'ionisation détermine la transformation $I' \rightleftharpoons II'$. Le titrage du trypsinogène de boeuf (comme celui du trypsinogène de porc)[17] indique toutefois l'existence d'une fonction anormale dont le pK apparent, corrigé de l'effet électrostatique, est 5.7 à 21°; il semble que ce groupe soit précisément celui qui détermine l'isomérisation $I' \rightleftharpoons II'$ puisque la valeur de pK apparent trouvée au moyen des courbes $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ — pH est très voisine de 6.1 à 21°. Il a été suggéré[17] que ce pK 5.7 puisse être celui d'un imidazole anormal. Malgré les données chimiques de HORINISHI *et al.*[28] qui indiquent la présence d'un imidazole de faible réactivité dans la molécule de trypsinogène, il nous semble nécessaire d'obtenir des données supplémentaires avant de pouvoir conclure avec certitude. Le trypsinogène de porc, comme le trypsinogène de boeuf, subit une isomérisation $I' \rightleftharpoons II'$ qui produit aussi le démasquage de résidus de tyrosine et de tryptophane. La fonction ionisable dont la protonation détermine cette transition a une valeur de pK_{app} identique dans les 2 zymogènes. Elle est de 6.0 à 20°, force ionique 0.1.

La transition $I \rightleftharpoons II$ de la trypsine est aussi une transition à 1 proton qui peut être décrite par les équations (2) et (3).

La pente des courbes log III'/II' — pH a une valeur minimum de 1.5 à force ionique 0.3 pour laquelle les effets électrostatiques sont les plus atténués (Fig. 3); il ne s'agit donc plus d'une transition à un seul proton. Les équations décrivant les transitions à 2 protons ont été établies par TANFORD[27]; ces isomérisations donnent des pentes inférieures ou égales à 2. La transformation $II' \rightleftharpoons III'$ (pente minimum 1.5) est donc probablement une transition à 2 protons. Les 2 fonctions ionisables qui la

* La ligne d'isoconcentration entre les formes I' et II' (Fig. 7) représente la variation de pK_{app} avec la température; pK_{app} augmente quand la température augmente. K_D ne peut qu'augmenter (ionisation endothermique) ou rester inchangée (ionisation athermique) quand la température s'élève; il faut donc que K_0 augmente plus vite que K_D entre 10° et 40°. Les concentrations de β' deviennent de plus en plus grandes quand la température s'élève, tout en restant très inférieures à celles de α'. Dans le cas limite où K_D serait indépendante de la température, K_0 varierait par un facteur 50 entre 10° et 40°. C'est là un chiffre minimum. Pour la trypsine au contraire, pK_{app} diminue quand la température augmente, K_0 croît donc beaucoup moins vite que K_D. La variation de pK_{app} n'étant que de 0.4 unités de pH entre 10° et 20°, —une variation raisonnable pour pK_D–, il semble en fait que K_0 reste inchangé.

déterminent sont masqués à l'état basique et démasquées à l'état acide. La constante apparente d'ionisation des 2 groupes anormaux est de 3.4 ± 0.1, elle ne varie pratiquement pas entre 10° et 40°. Les fonctions ionisables importantes pour la transition II′ ⇌ III′ auraient donc une enthalpie apparente d'ionisation nulle. C'est là une propriété des fonctions carboxyliques; la valeur 3.4 du pK apparent nous incite aussi à penser qu'il y a, dans la forme II′, 2 fonctions carboxyliques masquées à l'état basique. Cette anomalie des fonctions carboxyliques nous est d'ailleurs nettement apparue lors du titrage du trypsinogène de boeuf[17]. Les résultats expérimentaux précédemment obtenus[17] peuvent fort bien être décrits désormais par un tracé théorique calculé en utilisant une valeur normale de w, 0.033, et en divisant les fonctions carboxyliques en 2 familles: l'une d'entre elles est anormale, elle est formée des 2 acides carboxyliques dont le pK apparent moyen est de 3.4, l'autre est formé de 11 fonctions normales ayant un pK intrinsèque de 4.3. $\Delta F°-\Delta F_{\text{titr}}$ (équation 1) vaut environ + 4 kcal pour la transition II′ ⇌ III′.

La transition II ⇌ III de la trypsine présente les mêmes caractéristiques que II′ ⇌ III′. Les 2 fonctions carboxyliques seraient masquées à l'état basique dans la forme II; leur pK apparent est 3.0, il est constant entre 10° et 30°.

Transitions thermiques

Le calcul des courbes de transition du trypsinogène de boeuf a été effectué comme celui des courbes de transition de la trypsine correspondante[9]. Les courbes log K–1/T sont présentées dans la Fig. 9. La pente de ces courbes augmente distinctement à toutes les valeurs de pH lorsque la température s'élève. $\Delta H°_{\text{th}}$ est donc une

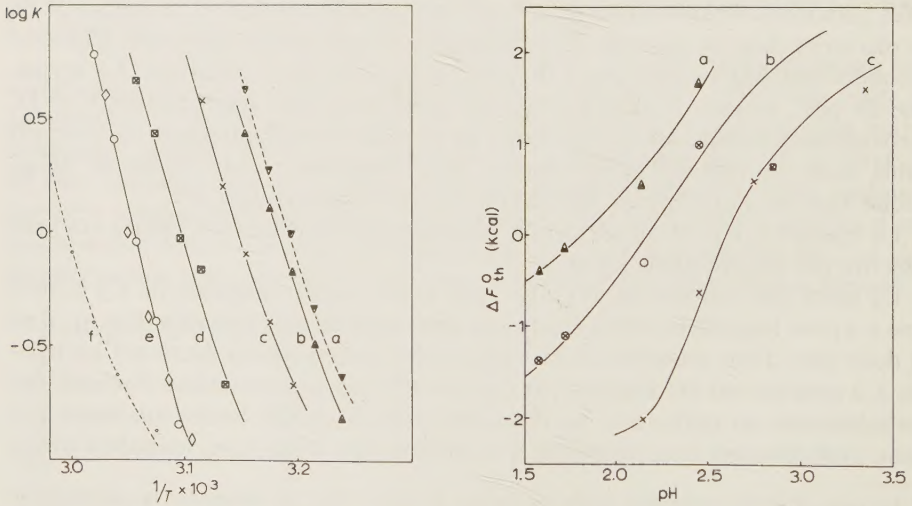


Fig. 9. Courbes log K − 1/T pour le trypsinogène de boeuf à pH 1.57 (a); pH 1.71 (b); pH 2.13 (c); pH 2.45 (d); pH 2.74 (e) par spectrophotométrie ○, par polarimétrie ◇; pH 3.36 (f). Les tracés pointillés des courbes (a) et (f) ont été obtenus avec la trypsine de boeuf à pH 1.57 et 3.25 respectivement.

Fig. 10. Influence du pH sur l'énergie libre de la dénaturation thermique du trypsinogène de boeuf aux températures 41° (a); 45° (b); 51° (c). Tous les points ont été obtenus par spectrophotométrie à l'exception de ⊠ obtenu par polarimétrie. Les tracés sont les courbes $\Delta F_{\text{th}}°$–pH obtenues à 41°, 45° et 51° avec la trypsine correspondante.

fonction de la température d'étude. La même observation a été faite avec la ribonucléase[29], le chymotrypsinogène A (bibl. 28) et la trypsine de boeuf[9]. Il est vraisemblable qu'il s'agit là d'une caractéristique générale de la dénaturation thermique des protéines monomères. L'influence très prononcée du pH sur $\Delta F°_{th}$ est observée (Fig. 10) avec le trypsinogène comme avec la trypsine de boeuf[9]. Les valeurs thermodynamiques obtenues par polarimétrie et par spectrophotométrie sont en bon accord.

Quelques unes des données précédemment obtenues avec la trypsine de boeuf[9] ont été représentées pour comparaison (Figs. 9 et 10). Les courbes log $K - 1/T$ obtenues avec les 2 protéines sont pratiquement confondues lorsqu'elles sont déterminées au même pH; les courbes $\Delta F°_{th}$ - pH sont pratiquement confondues lorsqu'elles sont déterminées à la même température.

Effets de l'éthanol sur la dénaturation thermique du trypsinogène. Comparaison avec la trypsine. Importance des interactions hydrophobes. Toutes les courbes de transition déterminées (à pH 2.70 et 1.97) en présence de cet alcool sont réversibles. La variation maximum de $\Delta\varepsilon_{293m\mu}$ produite par la transition thermique est indépendante de la concentration d'éthanol (entre 0 et 12 %). Ceci tend à prouver que la géométrie des formes "natives" II' ou III' comme celle de la forme dénaturée thermiquement, D', est inchangée par la présence de l'alcool. Celui-ci modifie cependant, à température donnée, la constante des équilibres II' $\rightleftharpoons$ D' ou III' $\rightleftharpoons$ D'.

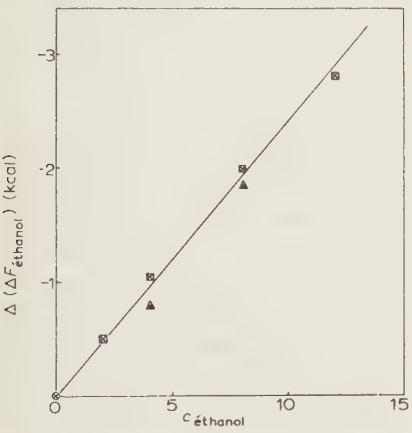


Fig. 11. Influence du pourcentage d'éthanol (C_{EtOH}) sur $\Delta(\Delta F_{EtOH})$. ○, Trypsinogène à 51.5°, pH 2.70; △, trypsinogène à 41° 5, pH 1.97; ⊠, trypsine à 51.5°, pH 3.03.

Nous avons porté dans la Fig. 11 l'influence de différentes concentrations d'éthanol sur la contribution à l'énergie libre de dénaturation $\Delta(\Delta F°$ éthanol) apportée par la présence de cet alcool. $\Delta(\Delta F°$ (éthanol)) = $\Delta F°$ (éthanol) $- \Delta F°_{th}$. $\Delta F°$ (éthanol) représente l'énergie libre standard de dénaturation dans un milieu contenant c % d'éthanol; $\Delta F°_{th}$ est évaluée en l'absence d'éthanol. Les données obtenues précédemment avec la trypsine de boeuf à pH 3.03 ont été représentées pour comparaison. Les différences entre les résultats obtenus avec l'enzyme et ceux qui ont été obtenus avec le zymogène sont minimes. L'effet de l'éthanol est pratiquement indépendant du pH; il semble bien qu'il soit dû par conséquent à un affaiblissement des interactions hydrophobes. L'examen plus approfondi des résultats trouvés précédemment avec la trypsine de boeuf[9] confirme d'ailleurs cette conclusion. La variation d'enthalpie

associée à la dénaturation thermique de la trypsine à 51° est de 101 kcal $\times$ M^{-1}, elle est indépendante de la concentration d'éthanol. Au contraire, les variations d'entropie dépendent de cette concentration; elles sont respectivement de 303, 309, 312, 317 et 322 unités d'entropie pour 0, 2, 4, 8 et 12 % d'éthanol. Cette augmentation de la variation d'entropie à variation d'enthalpie constante peut raisonnablement être considérée comme une bonne indication que l'éthanol détruit les structures en clathrates qui se forment en milieu purement aqueux autour des chaînes latérales hydrophobes de la protéine dénaturée. Plus le milieu est riche en éthanol, plus l'entropie de solvatation (très négative en l'absence d'alcool) augmente du fait de la destruction des clathrates.

Effet de la force ionique. Importance des effets électrostatiques. La dénaturation thermique des formes II′ et III′ du trypsinogène et des formes II et III de la trypsine est indépendante de la force ionique entre 0.1 et 0.4 M NaCl. La contribution électrostatique, ΔF_{elec}, à l'énergie libre de la dénaturation thermique de ces 4 formes est donc négligeable. La raison tient sans doute principalement aux 6 ponts disulfure de la protéine qui empêchent les formes D et D′ d'être de véritables pelotes statistiques. A pH 1.13 par contre on observe que les températures de transition dépendent considérablement de la force ionique; elles sont respectivement de 36°, 38.5°, 40° et 41.3° aux forces ioniques 0.1, 0.2 et 0.3 et 0.4. La même observation avait été faite avec la trypsine de boeuf[9]. L'influence de la force ionique n'apparaît donc que dans la zone de pH où les formes IV et IV′ sont thermodynamiquement stables.

Effet de ^2H_2O. Importance des liaisons hydrogène. Les températures de transition de la trypsine et du trypsinogène sont indépendantes de la présence de ^2H_2O à des pH (ou p^{2}H) supérieurs à 1.55. Les formes II, III, II′ et III′ ont donc la même stabilité dans les états hydrogénés et deutérés. Par contre, à des pH (ou p^{2}H) inférieurs à 1.55, les températures de transition sont plus élevées dans ^2H_2O que dans H_2O.

D'après Scheraga[15], l'énergie d'une liaison hydrogène doit être affectée par la substitution d'un hydrogène par un deutérium. La température de transition de la ribonucléase dont 35 % (bibl. 30) des hydrogènes d'amides sont difficilement échangeables est effectivement plus élevée lorsque la molécule est deutérée[15]; dans ce cas la stabilisation apportée par les liaisons hydrogène interamides ($n\Delta\bar{h}_H$) n'est pas négligeable. Puisque la substitution hydrogène–deutérium n'a pas d'effet sur la stabilité de II, (14 % des hydrogènes d'amide sont difficilement échangeables) III, II′ et III′ il semble au contraire que la contribution apportée par les liaisons hydrogène à la stabilisation de ces 4 formes soit faible en regard des autres contributions stabilisatrices. L'effet important de la substitution hydrogène -deutérium sur les transitions observées dans la zone de pH où IV et IV′ sont thermodynamiquement stables n'a pas fait l'objet d'une étude suffisamment approfondie pour qu'il soit possible de proposer une interprétation.

Conclusion. Les isomérisations acides sont dues principalement à la variation de ΔF_{tltr}. Ce terme est sans grande importance pour les dénaturations thermiques, il est nul pour III′ $\rightarrow$ D′ et II′ $\rightarrow$ D′ à pH 7, inférieur à -1 kcal pour II′ $\rightarrow$ D′ à pH 4.5. Puisque d'autre part les contributions $n\Delta\bar{h}_H$ et ΔF_{elec} sont mineures ou inexistantes, $\Delta F°_{th}$ est principalement dû à la différence $(-p\,NT\Delta\bar{S}_c + \sum_i^r \Delta f_{tr}^i)$. Cette différence vaut respectivement 0 et -2 kcal à 51° pour la transition III′ $\rightarrow$ D′ des trypsinogènes de porc et de boeuf.

CONCLUSIONS GÉNÉRALES

(1) *Propriétés structurales de la trypsine*

La forme I est la plus compacte et la plus stable de toutes les formes moléculaires identifiées avec la trypsine. Son isomérisation à pH acides se traduit par une perte de l'organisation de la molécule qui se manifeste particulièrement (1) par une fragilité plus grande à la dénaturation thermique et par l'urée; (2) par un démasquage de certains résidus masqués de tyrosine et de tryptophane; (3) par un démasquage des liaisons peptidiques de la lysine et de l'arginine qui sont hydrolysées lors de l'autolyse[9]. Les formes I, II, et III ont cependant des propriétés hydrodynamiques semblables.

I a 5 résidus de tyrosine normaux situés à sa surface et 5 résidus de tyrosine masqués à l'état acide[9].

SPANDE, GREEN ET WITKOP[31] ont montré que les résidus de tryptophane de la trypsine n'étaient pas oxydés par la *N*-bromosuccinimide à pH 7 alors qu'ils l'étaient facilement à pH 3. Les 4 tryptophanes de la molécule sont donc probablement masqués (partiellement ou entièrement) dans la forme I de telle sorte que le réactif n'y a pas accès. A pH 3, par contre, il y a une concentration importante de la forme III beaucoup moins compacte; l'accessibilité des tryptophanes à la *N*-bromosuccinimide est alors beaucoup plus facile et l'oxydation devient complète.

Les formes I et II sont assez peu différentes: leurs températures de transition et leurs dispersions rotatoires sont voisines. Les mêmes critères indiquent une modification de structure beaucoup plus importante au cours de la transformation II $\rightleftharpoons$ III (sans pour cela que le coefficient de sédimentation change). La forme IV est la moins bien organisée, elle a la stabilité thermique la plus faible. Le centre actif de la trypsine est constitué de 2 groupes ionisables fonctionnels à l'état basique: un imidazole[6,32] et un carboxylate[32]. La forme I fixe les substrats et les inhibiteurs qui la stabilisent d'ailleurs contre la dénaturation par l'urée, elle possède le pouvoir catalytique aux pH où l'imidazole est basique. Le titrage cinétique du centre actif réalisé à bas pH par STEWART ET DOBSON[32] suggère que la transition I $\rightleftharpoons$ II n'a pas modifié la morphologie du centre catalytique; la fraction des molécules de forme II dont le centre actif est totalement acide (Im-H^+ et COOH) ne pourra plus cependant fixer le substrat. Ni benzoyl-DL-arginine éthyl ester, ni benzoyl-DL-arginine amide ne stabilisent III contre la dénaturation thermique comme ils devraient le faire s'ils se fixaient à l'enzyme. Cela peut provenir soit de l'état d'ionisation inadéquat du centre actif resté intact, soit d'un changement de sa géométrie au cours de l'isomérisation II $\rightarrow$ III. La comparaison trypsinogène–trypsine (*vide infra*) nous permettra de nous rallier à la seconde hypothèse. Les formes IV et D, plus désorganisées ne fixent pas les substrats trypsiques.

(2) *Propriétés structurales du trypsinogène*

La succession des transitions I′ $\rightleftharpoons$ II′ $\rightleftharpoons$ III′ $\rightleftharpoons$ IV′ du trypsinogène ressemble beaucoup aux isomérisations I $\rightleftharpoons$ II $\rightleftharpoons$ III $\rightleftharpoons$ IV de la trypsine. I′ est la forme la plus compacte et la plus stable. Son isomérisation à pH acides se traduit par une perte de l'organisation de la molécule.

La forme I′ a 6 résidus de tyrosine masqués et 4 normaux[17]; ses 4 tryptophanes sont inaccessibles à l'oxydation par la *N*-bromosuccinimide[31]. Les 2 fonctions carboxyliques anormales masquées dans I′ et II′ sont probablement les mêmes que celles

qui sont masquées dans les formes I et II de la trypsine; il est donc peu vraisemblable qu'elles fassent partie de l'extrémité N-terminale (Val–(Asp)$_4$-Lys) de la molécule. Il existe dans la forme I' un site spécifique qui fixe un ion Ca^{2+} avec un pK de 3.25. Ce site n'existe plus dans II' et III' (bibl. 22). La morphologie de la forme II' est beaucoup plus semblable à celle de I' qu'à celle de III'. Ainsi les vitesses de dénaturation par l'urée de I' et II' sont-elles voisines alors qu'elles sont très différentes pour II' et III' (bibl. 22). La stabilité thermique de la forme II' est très supérieure à celle de II'. Entre pH 5 et 6, la transformation de I' en II' s'effectue à basses températures; la facilité de cette fusion provient de la fragilité des liaisons hydrophobes et hydrogènes qui se sont formées au cours de l'isomérisation II' → I'. La modification structurale I' → II' ne concerne sans doute qu'une faible fraction de la molécule de trypsinogène, elle suffit cependant à faire disparaître très largement l'affinité de la macromolécule pour l'ion Ca^{2+}.

Le trypsinogène de boeuf peut être transformé en trypsine dans diverses conditions expérimentales qui montrent que les formes I', II' et III' sont activables. L'activation du précurseur est généralement initiée par la trypsine elle-même, à un pH voisin de 8 et en présence de Ca^{2+} (bibl. 11 et 13). L'activation du trypsinogène en l'absence de Ca^{2+}, à pH 6.0, 2°, s'effectue sans qu'il y ait production de protéines inertes; elle peut être initiée par la trypsine ou par l'entérokinase[33]; dans ce cas, c'est la forme I' qui sert de substrat. GABELOTEAU ET DESNUELLE[34] ont montré que la peptidase d'*Aspergillus saitoi* activait le trypsinogène à pH 4.5, 0°. Dans ces conditions, le trypsinogène est largement sous la forme II'. La peptidase de Penicillium utilisée par NORTHROP, KUNITZ ET HERRIOTT[33] active le trypsinogène avec un pH optimum d'environ 3; la peptidase A de *Penicillium janthinellum* purifiée par HOFMANN ET SHAW[35] active le précurseur à pH 3.4 de 0° à 35° en coupant la même liaison Lys–Ile que la trypsine et la peptidase d'Aspergillus. Dans les conditions expérimentales de KUNITZ ou HOFMANN, le trypsinogène est un mélange des formes II' et III'. La peptidase d'*Aspergillus saitoi* active aussi la forme III' (bibl. 36).

(3) *Comparaison des différentes formes moléculaires du trypsinogène et de la trypsine*

L'activation du trypsinogène en trypsine ne produit pas de changement du nombre des formes moléculaires au dessous de pH 8; la comparaison forme à forme de précurseur et de l'enzyme est donc possible dans cette zone de pH.

L'activation de I' se fait sans modification du rapport de friction[23]; les volumes hydrodynamiques de I' et I sont donc semblables sinon identiques. Les caractéristiques rotatoires de I et I' sont données dans le Tableau I. Ces formes diffèrent aussi bien par α (Fig. 4) que par λ_c ou a_0, la valeur de b_0 est cependant la même. NEURATH a proposé d'attribuer le changement de pouvoir rotatoire à une augmentation du pourcentage d'α-hélice[23] au cours de l'activation. Il faut, semble-t-il, considérer cette conclusion avec prudence car ni les valeurs faibles de b_0, ni l'absence de concordance entre H_{193} et H_{225}, ni les effets Cotton de la trypsine observés par JIRGENSONS[37] dans l'ultraviolet lointain ne sont caractéristiques d'une organisation en α-hélice. L'incertitude de la détermination du pourcentage d'α-hélice empêche de suivre avec certitude son évolution au cours de l'activation. Le même problème se pose pour l'activation du chymotrypsinogène A de boeuf dont la séquence est largement homologue à celle du trypsinogène. Les études de dispersion rotatoire dans l'ultraviolet lointain effectuées récemment par SCHELLMAN[39] et LUMRY[40] infirment les conclusions anciennes d'IMA-

TABLEAU I

CARACTÉRISTIQUES ROTATOIRES DES FORMES I, I', III ET III'

		λ_c ($m\mu$)	a_0	b_0*	H_{193}	H_{225}
Trypsine	forme I	249 ± 3	−213 ± 8°	−143° ± 15°	24–27 %	11–15 %
	forme III	237 ± 2				
Trypsinogène	forme I'	240 ± 3	−280° ± 14°	−143° ± 18°	21–25 %	10–14 %
	forme III'	236 ± 2				

* λ_0 = 202 mμ.

HORI[38]; les auteurs concluent que le chymotrypsinogène a un pourcentage d'α-hélice très bas qui ne change que très peu lors de l'activation. Le trypsinogène qui a des propriétés rotatoires voisines de celles du chymotrypsinogène est sans doute, comme ce dernier, pratiquement dépourvu d'α-hélice. Ni l'activation du trypsinogène, ni celle du chymotrypsinogène[39] ne produisent de changement important de b_0; il semble donc que les conclusions de SCHELLMAN et de LUMRY puissent être extrapolées au trypsinogène.

La différence de structure entre I et I' se traduit par une sensibilité différente à la dénaturation par l'urée[22]. La dénaturation de I' dans l'urée 6.4 M est 12 fois plus rapide que celle de I. I est aussi beaucoup plus résistante que I' aux effets de pH et de température. A la différence de la transition I ⇌ II, I' ⇌ II' peut être réalisée à des pH et des températures modérés. L'activation de I' en I ne produit pas de changement du nombre des carboxylates masqués ni du nombre des tryptophanes accessibles à la *N*-bromosuccinimide. 1 des 6 résidus de tyrosine masqués dans I' est démasqué dans I; il convient toutefois de rappeler que les formes I' et I de la trypsine et du trypsinogène de porc ont le même nombre de tyrosines masquées (4 des 8 résidus) (bibl. 17). L'activation de I' en I a conservé le site de fixation de Ca^{2+} (bibl. 22).

Les formes moléculaires III et III' sont très intéressantes à comparer. Elles ont la même constante de Drude λ_c (Tableau I) et elles donnent naissance par dénaturation thermique aux formes D et D' qui ont elles aussi des caractéristiques rotatoires identiques (λ_c = 227 mμ). III et III' sont dénaturées par l'urée à la même vitesse, l'ordre par rapport à l'urée est le même pour les 2 formes[22]. Les caractéristiques de la dénaturation thermique de III et III' sont pratiquement identiques. Les températures de transition sont les mêmes aux mêmes pH. Les courbes log $K - 1/T$ (Fig. 9) et $\Delta F_{th}^{\circ} -$ pH (Fig. 10) obtenues avec le trypsinogène sont pratiquement confondues avec celles de la trypsine pour des pH (compris entre 1.4 et 3 pour la trypsine et entre 1.4 et 3.4 pour le trypsinogène) appartenant à une zone dans laquelle III' et III existent en quantités supérieures à 50 % de la quantité totale de la protéine. Les courbes $\Delta(\Delta F^{\circ}_{\text{éthanol}}) - c_{\text{éthanol}}$ sont à peu près confondues indiquant ainsi que les contributions hydrophobes qui stabilisent III et III' sont très voisines. Tous ces arguments semblent suffisants pour conclure à l'identité morphologique des formes III' et III*. La structure covalente de ces 2 formes diffère par l'hexapeptide Val · $(Asp)_4$ ·Lys qui est enlevé à la molécule de trypsinogène au cours de l'activation. Puisque III' et III ont une structure spatiale apparemment identique, l'hexapeptide

* La forme III ne peut donc avoir d'activité catalytique comme celà a déjà été écrit plus haut.

N-terminal du trypsinogène ne participe pas à la stabilisation de III'; il est à la surface de la molécule. Puisqu'il s'avère possible d'enlever l'hexapeptide N-terminal à la forme III' pour la transformer en III, l'activation du trypsinogène peut être réalisée en 2 étapes: III' → III, modification covalente sans changement de la structure spatiale. III → I, isomérisation entraînant la création du centre actif sans changement de la structure covalente.

Les transformations III' → I' et III → I entraînent une structuration importante des molécules de précurseur et d'enzyme, avec formation du centre actif dans le cas de III → I. Cette structuration se traduit par un renforcement considérable des interactions hydrophobes stabilisantes. Il y a donc, dans les 2 isomérisations III' → I' et III → I une tendance assez généralisée des résidus apolaires ou peu polaires à être mieux enfouis en l'intérieur hydrophobe des molécules.

Pourquoi les formes I' et I diffèrent-elles alors que les formes III' et III sont identiques? L'explication tient sans doute à la polarité considérable de l'extrémité N-terminale du trypsinogène. Aucun des 22 premiers résidus de l'extrémité N-terminale de la trypsine ne porte de charge à pH 8 dans la forme I; cette partie de l'enzyme pourra donc être commodément enfouie — partiellement ou entièrement — à l'intérieur de la molécule au cours de la transformation III → I qui entraîne la juxtaposition adéquate des divers éléments du centre actif. L'extrémité N-terminale du trypsinogène, Val–$(Asp)_4$–Lys est au contraire très polaire à tous les pH et porte même 6 charges (4 négatives et 2 positives) aux pH où I' est stable. Du fait de sa charge, l'hexapeptide N-terminal ne peut qu'être à la surface de la molécule de trypsinogène dans I' comme il l'est dans III'; c'est d'ailleurs une condition essentielle pour que la liaison Lys–Ile soit accessible aux enzymes qui provoquent l'activation. La position de l'hexapeptide N-terminal à la surface de la molécule empêche sans doute toute transformation du type III → I en gênant le mouvement vers l'intérieur hydrophobe du trypsinogène des amino acides qui sont N-terminaux dans la trypsine. L'ablation de l'hexapeptide N-terminal donne à la chaîne polypeptidique dans III une flexibilité qu'elle n'a pas dans III'.

RÉSUMÉ

Le trypsinogène comme la trypsine peuvent exister sous différentes formes moléculaires dont la stabilité dépend du pH et de la température. Ainsi, à 20°, l'acidification du trypsinogène et de la trypsine de pH 8 à pH 0.5 produit la succession des 3 isomérisations réversibles, pratiquement instantanées, I ⇌ II ⇌ III ⇌ IV pour la trypsine, I' ⇌ II' ⇌ III' ⇌ IV' pour le trypsinogène. La dénaturation thermique réversible de ces différentes formes moléculaires conduit à la forme D' pour le trypsinogène, D pour la trypsine. Ces différentes espèces moléculaires ont été placées dans des diagrammes d'état où sont définies les zones de température et de pH dans lesquelles elles sont thermodynamiquement stables. I ⇌ II et I' ⇌ II' sont des isomérisations à un proton. II ⇌ III et II' ⇌ III', sont des isomérisations à 2 protons, elles sont dues à la protonation, dans III et III', de 2 carboxylates initialement masqués dans II et II'. La modification de structure la plus importante à pH alcalins correspond au démasquage réversible des tyrosines anormales suivi très rapidement d'une dénaturation irréversible due à des modifications covalentes au niveau des ponts disulfure.

Les diagrammes d'état ont fait l'objet d'une étude thermodynamique.

Les diagrammes d'état permettent d'établir quelques unes des relations entre les propriétés moléculaires et fonctionnelles du trypsinogène ou de la trypsine. La comparaison des formes moléculaires du zymogène et de l'enzyme permet de mieux connaître l'importance des modifications morphologiques qu'entraîne l'activation, et partant, de mieux comprendre son mécanisme. L'article présente plusieurs résultats relatifs au trypsinogène de porc.

REMERCIEMENTS

Nous exprimons notre gratitude à Monsieur le Professeur DESNUELLE pour l'intérêt qu'il a porté à ces travaux.

Nous remercions Monsieur le Professeur J. REYNAUD qui a eu l'amabilité de réaliser les expériences d'ultracentrifugation.

BIBLIOGRAPHIE

1 K. A. WALSH ET H. NEURATH, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 52 (1964) 884.
2 V. HOLEYSOVSKY, V. TOMASEK, O. MIKES, A. DANILOVA ET F. SORM, *Collection Czech. Chem. Commun.*, 12 (1965) 929.
3 H. NEURATH, Conférences et Rapports, *3e Congr. Internat. Biochimie*, Bruxelles, 1955, p. 89.
4 P. DESNUELLE ET M. ROVERY, Conférences et Rapports, *3e Congr. Internat. Biochimie*, Bruxelles, 1955, p. 78.
5 G. H. DIXON, D. L. KAUFFMAN ET H. NEURATH, *J. Am. Chem. Soc.*, 80 (1958) 1260.
6 E. SHAW, M. MARÈS-GUIA, W. COHEN, *Biochemistry*, 4 (1965) 2219.
7 C. B. ANFINSEN ET E. HABER, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 1361.
8 H. ZAHN, *Naturwissenschaften*, 52 (1965) 99.
9 M. LAZDUNSKI ET M. DELAAGE, *Biochim. Biophys. Acta*, 105 (1965) 541.
10 M. DELAAGE ET M. LAZDUNSKI, *Biochim. Biophys. Acta*, 105 (1965) 608.
11 M. CHARLES, M. ROVERY, A. GUIDONI ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 69 (1963) 115.
12 S. MAROUX, M. ROVERY ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 56 (1962) 202.
13 M. LAZDUNSKI, *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 47 (1965) 301.
14 E. SCHECHTER ET E. R. BLOUT, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 51 (1964) 695.
15 H. A. SCHERAGA, *Protein Structure*, Academic Press, New York, 1961.
16 F. F. NORD ET M. BIER, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 56.
17 M. DELAAGE ET M. LAZDUNSKI, *Biochim. Biophy. Acta*, 105 (1965) 523.
18 A. D'ALBIS, *Compt. Rend.*, 259 (1964) 1819.
19 M. L. ANSON ET A. E. MIRSKY, *J. Gen. Physiol.*, 17 (1934) 393.
20 A. D'ALBIS, *Thèse 3e Cycle*, Université de Paris, 1964.
21 L. B. SMILLIE ET C. M. KAY, *J. Biol. Chem.*, 236 (1961) 112.
22 M. DELAAGE ET M. LAZDUNSKI, à paraître.
23 H. NEURATH, *Advan. Protein Chem.*, 12 (1957) 319.
24 D. M. YOUNG ET J. T. POTTS Jr., *J. Biol. Chem.*, 238 (1963) 1995.
25 C. TANFORD, *J. Am. Chem. Soc.*, 84 (1962) 4240.
26 J. F. BRANDTS, *J. Am. Chem. Soc.*, 86 (1964) 4302.
27 C. TANFORD, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 1628.
28 H. HORINISHI, Y. HACHIMORI, K. KURIHARA ET K. SHIBATA, *Biochim. Biophys. Acta*, 86 (1964) 477.
29 J. HERMANS Jr. ET H. SCHERAGA, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 3283.
30 E. R. BLOUT, C. DE LOZÉ ET A. ASADOURIAN, *J. Am. Chem. Soc.*, 83 (1961) 1895.
31 T. F. SPANDE, N. M. GREEN ET B. WITKOP, *Biochemistry*, 5 (1966) 1926.
32 J. A. STEWART ET J. E. DOBSON, *Biochemistry.*, 4 (1965) 1086.
33 J. H. NORTHROP, M. KUNITZ ET R. M. HERRIOTT, *Crystalline Enzymes*, Columbia University Press, New York, 1948, p. 125.
34 C. GABELOTEAU ET P. DESNUELLE, *Biochim. Biophys. Acta*, 42 (1960) 230.
35 T. HOFMANN ET R. SHAW, *Biochim. Biophys. Acta*, 92 (1964) 543.

36 M. LAZDUNSKI ET M. DELAAGE, à paraître.
37 B. JIRGENSONS, *J. Biol. Chem.*, 241 (1966) 147.
38 K. IMAHORI ET J. TANAKA, *J. Mol. Biol.*, 1 (1959) 359.
39 D. N. RAVAL ET J. A. SCHELLMAN, *Biochim. Biophys. Acta*, 107 (1965) 463.
40 R. BILTONEN, R. LUMRY, V. MADISON ET H. PARKER, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 54 (1965) 1412.